

## DEUTSCHLAND



⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3808456 A1**

(21) Aktenzeichen: P 38 08 456.2  
 (22) Anmeldetag: 14. 3. 88  
 (43) Offenlegungstag: 28. 9. 89

(51) Int. Cl. 4:  
**C07K 13/00**  
C 07 K 9/00  
A 61 K 37/02  
C 12 P 21/02  
// (C12P 21/02.  
C12R 1:91)C12P 19/  
4(C12P 21/02.  
C12R 1:645)

DE 3808456 A1

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000  
München

Hoffmann, Werner, Dr., 8600 München, DE

**54) Polypeptide zur Verwendung in spasmolytischen Arzneimitteln oder als Neurotransmitter**

### Das Polypeptid Präprospasmodolysin mit der Aminosäuresequenz

[illegible]

und bestimmte Fragmente desselben sind neu und weisen eine spasmolytische Wirksamkeit auf, die sie für Arzneimittelanwendungen interessant macht. Zu ihrer Herstellung bringt man eine für die Aminosäuren des Polypeptids kodierende DNA-Sequenz oder die entsprechende mRNA in einem geeigneten Wirtsorganismus nach an sich bekannten Methoden zur Expression und isoliert das Polypeptid aus den Wirtszellen oder ihrem Nährmedium.

**DE 38 08 456 A 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide mit spasmolytischer sowie Neurotransmitter-Wirksamkeit.

Aus pharmakologischen Untersuchungen ist bekannt, daß die Haut von Fröschen eine reichhaltige Quelle für verschiedenartige physiologisch aktive Peptide darstellt. Beim Südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis*, können zumindest manche solcher Peptide in aus Vakulen abgeleiteten Vorratskörpern in den Granular-Hautdrüsen akkumulieren und durch starke Stimulation über holokrine Sekretionsmechanismen zur Ausschüttung gebracht werden. Viele dieser Froschhautpeptide kommen in gleicher oder ähnlicher Form noch in anderen Regionen des "diffusen neuroendokrinen Systems" vor, wie im Gastrointestinaltrakt und im Nervensystem (Erspamer, V., Trends Neurosci., 6, 200—201 [1983]). Beispiele für solche Peptide in der Haut von *X. laevis* sind Caerulein (Anastasi et al., Brit. J. Pharmacol., 38, 221—228 [1970]) ein Mitglied der Cholecystokinin-Gastrin-Familie, das Thyreotropin Releasing Hormon (Bennet et al., Biol. Int. Rep., 5, 151—158 [1981]), das in identischer Form im Hypothalamus höherer Vertebraten vorkommt, und Xenopsin (Araki et al., Chem. Pharm. Bull., 21, 2801—2804 [1973]), das homolog zu Neurotensin ist.

Lange Zeit war die Funktion verschiedener physiologisch aktiver Peptide, die in der Froschhaut synthetisiert werden, unbekannt. Es ergaben sich jedoch in letzter Zeit Hinweise darauf, daß das Sekret der Granular-Drüsen eine Hauptrolle bei Abwehrfunktionen spielt (Giovannini et al., Biochem. J., 243, 113—120 [1987]).

Zu solchen Abwehrfunktionen gehört im weitesten Bereich auch eine spasmolytische Funktion.

Spasmolytische Agentien werden heute verstärkt auf pharmazeutischem Gebiet eingesetzt. Als Spasmolytika werden krampflösende Mittel verstanden, d. h. Verbindungen, die zu einer Erschlaffung der Organe mit glatter Muskulatur führen und die daher bei Spasmen des Respirations-, Verdauungs- und Ausscheidungsstrakts eingesetzt werden. Hierfür ist es von besonderem Vorteil, wenn spasmolytischen Agentien auch bei längerer Einnahme für den Patienten keine Gesundheitsgefährdung darstellen.

Nachdem bekannt war, daß in Tieren auch spasmolytische Proteine und Peptide endogen synthetisiert werden, bestand die Aufgabe der Erfindung darin, derartige spasmolytisch wirksame Polypeptide und Proteine ausfindig zu machen, und ihre Herstellung auf gentechnologische Weise zu ermöglichen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Polypeptid Präprospasmolysin mit der Aminosäuresequenz

```

30      1  NHHTILCINFLNNVGLGQADDCGVAFNMRVNCGYFTVTEADCRVAGCCCFDSSILNTKWE
      61  FYNATAGPINKLECSGDPRTLRIDCGFRITENCCILRGCCCFDSSISGVKNQYARTVITTP
      121  APDITTAAGTTAETTTVATTPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTT
35      181  VPTTRETITTVPTTRETITTVPTTRETITTVPTTRETITTVPTTRETITTVPTTRETITTAETTAE
      241  TTTVPETTTRETITTTETTTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTA
      301  RPFECADRVDCGYSSITQADCEGLGCIFFSTIPETKWCFTYAEARPAALAECTVDFSVR
40      361  TDCGYFGITDKECREKGCYSECIFDVIMCFEIAVFMVNS.

```

Dieses Polypeptid ist ein Vorläufer für vier verschiedene Fragmente, welche durch posttranslationale Prozessierung erhalten werden. Diese bevorzugten Polypeptidfragmente sind

a) Prospasmolysin, ein Fragment des obengenannten Präprospasmolysins mit der Aminosäuresequenz

```

50      1  QDCGVAFNMRVNCGYFTVTEADCRVAGCCCFDSSILNTKWCFTYNATAGPINKLECSGDPRTK
      61  RIDCGFRITENCCILRGCCCFDSSISGVKNQYARTVITTPAPDITTAAGTTAETTTVPETTF
55      121  ETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVP
      181  TTPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTVPETTTASTTAETTTVPETTTETTTETTT
60      241  DTTFPTLPTTRETITTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTETTTA
      301  DCEGLGCIFFSTIPETKWCFTYAEARPAALAECTVDFSVRTDCGYFGITDKECREKGCY
      361  DECIFDVIMCFEIAVFMVNS,
65

```



genaue Beschreibungen der üblichen molekulargenetischen Techniken können aus Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982), Ammerer, G., Methods Enzymol., 101, 192—201 (1983), Hoffmann, W., J. Biol. Chem., 260, 11831—11837 (1975), und Pandidos and Wilkie, in Hames, B. D., and Higgins, S. J. (eds), Transcription and Translation, IRL Press, Oxford, Seiten 1—48 (1984), entnommen werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform verwendet man als Wirtszellen Hefezellen und als Expressionsvektor ein Hefeexpressionsplasmid. Hierfür benötigte Expressionskontrollsequenzen sowie die Auswahl einer geeigneten Hefe-Signalsequenz und bevorzugter Kodons für die Expression der gewünschten Aminosäuresequenz in Hefe sind an sich bekannt (siehe z. B. B. L. A. Carter et al. [1987] in DNA-cloning, Volume III [D. M. Glover, ed.], S. 141—161; IRL-Press, Oxford).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird aus einer für das gewünschte Polypeptid oder Fragment kodierenden DNA-Sequenz nach an sich bekannten Methoden die entsprechende mRNA hergestellt und diese durch Mikroinjektion in eukaryontische Wirtszellen eingebracht.

Hierdurch wird eine direkte Expression der eingebrachten mRNA, ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Transkription der entsprechenden DNA im Wirtsorganismus erreicht. Bevorzugt verwendet man als eukaryontische Wirtszellen *Xenopus laevis*-Oocyten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel mit spasmolytischer Wirksamkeit, welches mindestens eines der erfindungsgemäßen Polypeptide als Wirkstoff enthält.

Ein wiederum weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel mit Neurotransmitterwirksamkeit, das ebenfalls mindestens eines der erfindungsgemäßen Polypeptide als Wirkstoff enthält.

Erfindungsgemäß gelingt es, bisher unentdeckte Polypeptide, welche in der Haut von *Xenopus laevis* produziert werden, durch die Kenntnis ihrer Aminosäuresequenz auf gentechnologische Weise herzustellen.

Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Figuren die Erfindung weiter.

Fig. 1 zeigt schematisch die molekulare Klonierung von Präprospasmodysin in pSVL DSM 4433;

Fig. 2 zeigt die DNA-Sequenzen von Präprospasmodysin, welche in den Plasmiden pUF 1380 DSM 4434 und pUF 504 DSM 4432 enthalten sind. Dabei wurde ds-cDNA aus *X. laevis*-Ikt über die GC-Homopolymertechnik in die PstI-Schnittstelle des Plasmids pUC8 inseriert (Hoffmann et al., EMBO J., 2, 111—114 [1983]). Restriktionsschnittstellen und das Polyadenylierungssignal sind unterstrichen. Punktmutationen in pUF 504 werden in der oberen Zeile angezeigt.

### Beispiel 1

#### Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide in COS-Zellen

Der cDNA-Klon pUF 1380 DSM 4434 wurde wie in Fig. 1 schematisch dargestellt, mit Eco RI und nachfolgend limitiert mit Ba131 verdaut, so daß der GC-Homopolymerschwanz entfernt wurde. Hierbei wird darauf geachtet, daß nur die 5'-nicht-kodierende Region von Präprospasmodysin-mRNA entfernt wird, der Verdau also zwischen Position 1 und Position 27 (Fig. 2) stehenbleibt. Sodann wurde mit XhoI-Linkern relegiert. Die entstandene Hilfskonstruktion wurde in *E. coli* eingebracht und vermehrt, dann nach Isolierung der vermehrten DNA das XhoI-PvuII-Fragment (Fig. 1, 2), welches für die N-terminale Hälfte der Spasmodysinvorstufe kodiert, isoliert. Unabhängig hiervon wurde der cDNA-Klon pUF 504 DSM 4432 mit HindIII verdaut und ebenfalls ein limitierter Ba131-Verdau durchgeführt, so daß der GC-Homopolymerschwanz entfernt wurde. Hierbei dürften bis zu 138 Basen (entsprechend der 3'-nicht-kodierenden Region der mRNA-Sequenz) eliminiert werden, so daß der Verdau zwischen Position 1231 und Position 1368 (Fig. 2) zum Stillstand kommt und das Stopkodon TAA erhalten bleibt. Eine Religation fand mit SacI-Linkern statt.

Diese Hilfskonstruktion wurde ebenfalls in *E. coli* vermehrt und aus der isolierten DNA das PvuII/SacI-Fragment (Fig. 1, 2), welches für die C-terminale Hälfte der Spasmodysinvorstufe kodiert, isoliert. Diese beiden Fragmente wurden in Tripelligation in das 4,8 kB große XhoI-SacI-Fragment des SV40-Expressionsvektors pSVL DSM 4433 (Templeton and Eckhart, Mol. Cell Biol., 4, 817—821 [1984]; Derivat von pJC119 [Sprague et al., J. Virol., 45, 773—781 [1983]; kommerziell erhältlich von PHARMACIA) einligiert. Nach Vermehrung in *E. coli* und anschließender Restriktionsanalyse wurde eine Plasmidkonstruktion isoliert, die die DNA-Fragmente in der Reihenfolge enthält, daß sie für die Aminosäuresequenz von Präprospasmodysin kodieren, und COS 1-Zellen (Gluzman, Y., Cell., 23, 175—182 [1981]; ECACC 88030801) damit nach der modifizierten DEAE-Dextranmethode (Sompayrac and Danna, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7575—7578 [1981]) unter Verwendung von Chloroquin (Luthman and Magnusson, Nucleic Acids Res., 11, 1295—1308 [1983]) transfiziert. Im Medium wurden nach Kultivierung der Zellen die folgenden Produkte erhalten: Spasmodysin I, Spasmodysin II, Spasmodysin-Glykoprotein, Prospasmodysin. Die Anwesenheit dieser Fragmente wurde über Polyacrylamid-Gelelektrophorese festgestellt.

### Patentansprüche

#### 1. Polypeptid Präprospasmodysin mit der Aminosäuresequenz

1 M K H I I L C I H F L L M V G L G Q A D C G S V A P N H R V N C G Y P T V T E A D C R A V G C C F D S S I L N T K W C  
61 F Y N A T A G P I K K L E C S G D P T H R I D C G F P R I T E K O C I L R G C C F D S S I S G V K W C Y A R T V I T T F  
121 A P D T T T A S T T A S T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T  
181 V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T V P T T P E T T T A S T T A E  
241 T T T V P T T P E T T T E P T T T T T T D T T P T L P P T P E T T T E T T T T E T T T E T T T E T T T E T T T A  
301 F P P E C A A D R V D C G Y S S I T A D C E G K G C I F D S T I P E T K W C F Y T E A E A P A R K A E C T V D F S V R  
361 T D C G Y P G I T O K E C R E K G C C Y D E C I P D V I W C F E K A V P V V N S

**2. Fragment Prospasmodolysin des Polypeptids von Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz**

[illegible]

**enthält**

3. Fragment Spasmolysin I des Polypeptids von Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

1 QDCSVAFNNRUNCGYPTVTEACCRAVGCCFDSSILNTIHCFFYNATAGFI 40

**enthält.**

4. Fragment Spasmolysin II des Polypeptids nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

1 ABCTVDFSVRTDCGYFBITDMECRXGCCYDECIFDVINCFEKAUFVUNS

**enthält**

5. Fragment Spasmodysin-Glykoprotein des Polypeptids nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

1	LECGGDPTRIDCGFRITERKOCILRGCCFDSSISGVKWQYARTVITTPAPDTTASTTA	
61	ETTTVTTPETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVP	55
121	TVPTTTVPFTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETTIVPTTFETT	
181	TEPTTTPTTDTPETLPPPTSTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAPPFGCAACRD	60
241	CGYGGITQDCGGHGCIFDSTIFETKWCFYTEASAPA	

enthalten

6. Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in wenigstens einer der Positionen 1, 4, 5, 8, 9, 11, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 33, 35, 36 und 42 bis 49 der Sequenz der Aminosäurerest gegen einen an derselben Position in einem der anderen Fragmente vorhandenen Aminosäurerest ausgetauscht ist

oder/und ein D—E-, I—L-, K—R-, N—Q- oder/und S—T-Austausch vorliegt.

7. Fragment nach einem der vorhergehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der beiden repetitiven Einheiten VPTTPETTT oder/und ETTT bezüglich ihrer Anzahl oder VPTTPETTT zu ASTTAETTT verändert ist oder Q in Position 1 gemäß den Ansprüchen 2 und 3 gegen pyroGlu ausgetauscht ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man eine für die Aminosäuren des Polypeptids kodierende DNA-Sequenz oder die entsprechende mRNA in einem geeigneten Wirtsorganismus nach an sich bekannten Methoden zur Expression bringt und das Polypeptid aus den Wirtszellen oder ihrem Nährmedium isoliert.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor inseriert und durch Transformation in eukaryontische Wirtszellen einbringt.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als eukaryontische Wirtszellen SV40-transformierte Affennieren-Zellen und als Expressionsvektor ein SV40-Expressionsplasmid verwendet.

11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als eukaryontische Wirtszellen Hefezellen und als Expressionsvektor ein Hefeexpressionsplasmid verwendet.

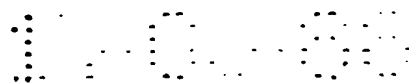
12. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man aus der DNA-Sequenz nach an sich bekannten Methoden die entsprechende mRNA herstellt und diese durch Mikroinjektion in eukaryontische Wirtszellen einbringt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirtszellen *Xenopus laevis* Oocyten verwendet.

14. Arzneimittel mit spasmolytischer Wirksamkeit, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Wirkstoff enthält.

15. Arzneimittel mit Neurotransmitterwirksamkeit, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Wirkstoff enthält.

Figur 2



3808456 AS \*

1 TTTTTTTTTTTTGGTAAGGCAACTAAAATGAAGCACATAATTCTCTGTATTCATTTCTTCTGATGGTCGTAGGC  
M K H I I L C I H F L L M V V G

76 TTAGGCCAGGCCCAAGACTGTTCCGGTTGCTCCAAATATGAGAGTGAAGTGTGGGTATCCAAGTGTACCGAGGCT  
17 L G Q A Q D C S V A P N M R V N C G Y P T V T E A

151 GACTGTAGAGCAGTAGGATGCTGCTTTGATTCCAGTATCCTTAACACTAAATGGTGCTTCTATAATGCAACAGCA  
42 D C R A V G C C F D S S I L N T K W C F Y N A T A

BamHI

226 GGTCCAATCAAGAACTCGAATGCAGTGGGGATCCTACTAAGAGAATAGACTGCGGATTCCCAAGAATAACAGAG  
67 G P I K K L E C S G D P T K R I D C G F P R I T E

301 AAACAATGCATTCTAAGAGGATGCTGTTTTGATTCCAGTATTTCCGGTGTTAAATGGTGCTACGCACGTACAGTT  
92 K Q C I L R G C C F D S S I S G V K W C Y A R T V

PstI

376 ATAACAACCTCCAGCACCAGATACAACCTACAGCTTCAACAACCTGCAGAAACAACCTACAGTCCAACAACCTCCAGAA  
117 I T T P A P D T T T A S T T A E T T T, V P T T P E

pUF504 PstI  
(C T → G)504

451 ACAACTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCT  
142 T T T, V P T T P E T T T, V A P S T T P A E T T T, V A P S T T

526 CCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCA  
167 P A E T T T, V P T T P E T T T, V P T T P E T T T, V P

601 ACAACTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACA  
192 T T P E T T T, V P T T P E T T T, V P T T P E T T T

PstI

676 GTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGCTTCAACAACCTGCAGAAACA  
217 V P T T P E T T T, V P T T P E T T T, A S T T A E T

751 ACTACAGTTCCAACAACCTCCAGAAACAACCTACAGAACCGACTACAACACCAACAACAGATACTACACCACCAACA  
242 T T, V P T T P E T T T, E P T T T P T T D T T P P T

826 CTACCACCAACACCAGAAACAACCTACAGAAACAACCTACAGAAACAACCTACAGAAACAACCTACAGAAACAACCTACA  
267 L P P T P E T T T, E T T T, E T T T, E T T T, E T T T

PvuII

901 GAAACAACCTACAGAAACAACCTACAGCTCCACCACCAGAATGTGCAGCTGACAGAGTGGACTGTGGATACAGTGGG  
292 E T T T, E T T T, A P P P E C A A D R V D C G Y S G

pUF1380

976 ATTACCCAGGCAGATTGCGAAGGAAAAGGCTGCATCTTCGATTCCACTATCCCTGAAACAAAATGGTGCTTCTAT  
317 I T Q A D C E G K G C I F D S T I P E T K W C F Y

1051 ACAGAGGCAGAAAGCTCCAGCTAGGAAAGCAGAATGTACAGTGGACCCAGTGTAAGAACTGACTGTGGATACCCA  
342 T E A E A P A R K A E C T V D P S V R T D C G Y P

1126 GGGATTACAGACAAAGAATGCAGGGAGAAGGGTTGCTGTTATGATGAATGTATTCTGACGTTATATGGTGCTTC  
367 G I T D K E D C R E K G C C Y D E C I P D V I W C F

1201 GAAAAAGCAGTTCCTGTTGTTAATAGTTAAATATGAAAGCAACACAGGCACCTTAATTGATGGGATACACAGAGA  
392 E K A V P V V N S

1276 TCATCAGATCACAGAAATTTACAAGTTTTGATTTCAAATGGAATATGTAATCAAGGATGTGTGTTGATTAACCTCC

1351 CAATAAAACAATTCTGCA

3808456

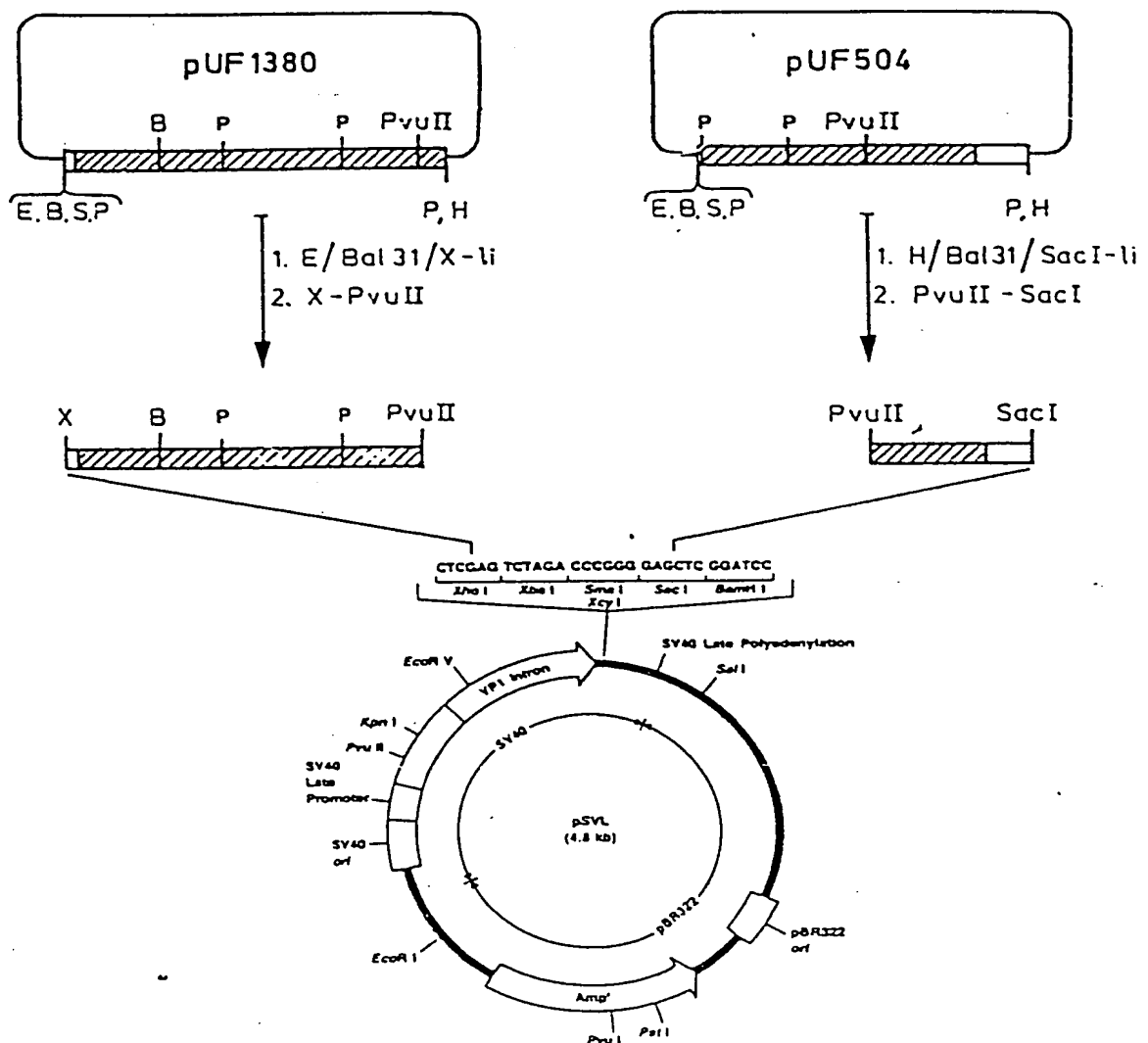
*Example 1*

Nummer: 38 08 456  
Int. Cl. 4: C 07 K 13/00  
Anmeldetag: 14. März 1988  
Offenlegungstag: 28. September 1989

**Figur 1** Molekulare Klonierung von Präprospasmodolysin in pSVL:

B=BamHI, E=EcoRI, H=HindIII, P=PstI, S=SalI,  
X=XhoI, li=Linker

Die kodierenden Regionen sind schraffiert dargestellt.





L3 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 1996 DERWENT INFORMATION LTD  
 AN 89-286097 [40] WPIDS  
 DNC C89-126674  
 TI New polypeptide preprosasmolysin and its fragments - derived from  
 Xenopus laevis, with **spasmolytic** and neuro-transmitter  
 activities.  
 DC B04 D16  
 IN HOFFMANN, W  
 PA (PLAC) MAX PLANCK GES FOERDERUNG WISSENSCHAFTEN  
 CYC 1  
 PI DE 3808456 A 890928 (8940)\* 8 pp  
 ADT DE 3808456 A DE 88-3808456 880314  
 PRAI DE 88-3808456 880314  
 IC A61K037-02; C07K009-00; C07K013-00; C12P021-02

=> d ab

L3 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 1996 DERWENT INFORMATION LTD  
 AB DE 3808456 A UPAB: 930923  
 The specified peptide preprospasmolysin (I) is new. Also new are (1)  
 prospasmolysin (II), i.e. (I) without the first 20 amino acids; (2)  
 spasmolysin I (III), i.e. the first 49 amino acids of (II), (3)  
 spasmolysin II (IV), i.e. the last 50 amino acids of (II); (4)  
 spasmolysin-glycoprotein (V), i.e. amino acids at positions  
 1,4,5,8,9,11,20,21,22,24,25,26,33, 35,36 and 42-49 are replaced by  
 another amino acid present in the same position in one of the other  
 fragments, and/or they contain the exchanges D-E; I-L; K-R; N-Q  
 and/or S-T.  
 DNA, or mRNA corresponding to these peptides are derived from  
 the skin of the frog Xenopus laevis and inserted conventionally into  
 these organisms for expression. Particularly, a DNA sequence is  
 inserted into a vector and this used to transform eucaryotic cells  
 (esp. COS, CMO or yeast cells), or the DNA sequence is converted to  
 mRNA and the microinjected into eucaryotic cells, esp. X laevis  
 cocytes.  
 USE - These peptides have **spasmolytic** and  
 neurotransmitter activities.  
 0/2